文章编号：0454-6296（2000）增刊-0032-06

酶标板法监测棉蚜乙酰胆碱酯酶对杀虫剂的不敏感性

冯国蕾，李 梅，赵章武，何凤琴
（中国科学院动物研究所，农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080）

摘要：用酶标板法测定了不同浓度有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂在反应不同时间内对棉蚜 *Aphis gossypii* 乙酰胆碱酯酶(AChE)的抑制作用。结果表明有机磷杀虫剂甲基 1605，辛硫磷，久效磷，氧乐果和乙酰甲胺磷对棉蚜 AChE 均无明显的抑制作用。当用 0.01 mol/L 灭多威与酶及底物反应 1 h 对北京棉蚜(敏感)种群 AChE 的抑制率可达 82.4%，与反应 2 h 89.4% 仅差 7%。因此以 0.01 mol/L 灭多威反应 1 h 测定棉蚜 AChE 对它的敏感性是合理的。通过测定北京地区寄主为鼠李和棉花以及山东高密寄主为棉花的棉蚜种群中个体 AChE 活性的分布和灭多威对其抑制的分布，表明 3 个棉蚜种群中 AChE 个体频率的分布差异不大，而灭多威对三个种群个体 AChE 的抑制率小于 30% 的个体分别为 2.4%、16% 和 29%。抑制率大于 70% 的个体分别为 72%、33% 和 1%，与生物测定结果一致。因此，用酶标板法测定棉蚜个体 AChE 对氨基甲酸酯的不敏感性频率可作为棉蚜对氨基甲酸酯抗性的监测技术，为棉蚜化学防治提供依据。

关键词：棉蚜；酶标板法；乙酰胆碱酯酶；杀虫剂
中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A

棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 是为害棉花、西瓜、黄瓜、西葫芦、茄子、菊花等的主要害虫，因其生命周期短，繁殖力强，严重地影响经济作物的产量。目前使用杀虫剂防治棉蚜仍是最主要的手段。有关棉蚜对杀虫剂抗性的报道较多。1980 年日本用杀虫剂防治西瓜和甜瓜[1]，黄瓜和菊花[2]上的棉蚜失败。英国早在 1975 年在温室中开始使用抗蚜威防治葫芦科植物和菊花上的棉蚜效果突出，使用几年后发现因棉蚜产生抗性，导致防治失败[3]。美国至少有三个州（Mississippi，California 和 Alabama）报道了棉蚜对有机磷杀虫剂的抗性[4,5]。我国早在 1964 年就报道了棉田棉蚜对 1059 产生抗性[6]，随后有关棉蚜对杀虫剂的抗性报道很多[7~9]。

棉蚜对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性机制主要涉及非特异性酯酶和 AChE 变构[10~12]。当然多功能氧化酶也是导致棉蚜对杀虫剂抗性和交互抗性的原因。由于棉蚜匀浆后体内产生内源抑制剂以至于体外无法进行测定[10]。为了提高害虫抗性检测水平，目前已成功地使用快速、简易和准确的滤纸酯酶方法测定个体棉蚜酯酶的活性，以监测田间蚜虫种群中抗性棉蚜、敏感棉蚜和杂合子棉蚜酯酶基因表现型的频率分布[13,14]。但这方法并不适合于

基金项目：国家“九五”科技攻关项目和国家重点自然科学基金项目（批准号：39630210）
收稿日期：1999-07-19；修订日期：2000-02-24

氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性监测。

本文用酶标板法测定棉蚜 AChE 和氨基甲酸酯对 AChE 的抑制作用，试图以快速简易准确的方法监测田间种群中棉蚜对氨基甲酸酯类杀虫剂抗性、敏感和杂合等个体表现型的频率，以利于抗性预测。为指导轮换使用杀虫剂和延缓棉蚜抗性发展，提高综合治理水平提供依据。

1　材料与方法

1.1　棉蚜

采自中国科学院动物研究所院内木槿上的无翅成蚜，接种到棉苗上饲养后的棉蚜（京蚜，敏感种群）；北京地区鼠李上采集的棉蚜（京鼠蚜）；山东高密棉田内采集的棉蚜（高棉蚜，抗性种群）。

1.2　试剂与仪器

碘化硫代乙酰胆碱（ATChI）和二硫双硝基苯甲酸（DTNB），SIGMA 公司产品；Triton X-100，上海化学试剂厂；其他试剂均为分析纯。

仪器：酶标仪，BIO-RAD MODEL 450。

1.3　生物测定

参照孙耘芹等（1987）的方法[10]。测试药剂用丙酮配制，稀释 5～6 个浓度，用定量毛细管点滴器将药液点滴在蚜虫背部。每个浓度重复 3 次，另用丙酮作空白对照。处理后的蚜虫在正常条件下饲养，5 h 检查死虫数，计算 LD_{50}。

1.4　棉蚜乙酰胆碱酯酶（AChE）活性的测定

取 50 头无翅成蚜以每头 60 μL 磷酸缓冲液（含 0.1% Triton X-100，pH7.4）匀浆，在 3 500 r/min离心 10 min，取上清液作为酶源于 4°C 冰浴中。在 96 孔微量滴度酶标板中每个孔先加 50 μL 磷酸缓冲液，在横列 A 的 1～12 列中加 3 μL 无水乙醇，横列 B～G 分别加 3 μL 不同浓度杀虫剂（无水乙醇配制），每 3 个孔为重复，每孔加 20 μL 棉蚜匀浆液，室温 25°C 保持 10 min，加 200 μL 的 ATChI（终浓度为 0.5 mmol/L）和 DTNB（终浓度为 5 μmol/L）的混合液。横列 H 项除不加酶，其他相同作为空白对照以进行校正。在酶标仪上 414 nm 间隔时间为 0，0.5 h，1 h，和 2 h 测 OD 值，计算 AChE 活力。

1.5　棉蚜种群中个体 AChE 和杀虫剂对棉蚜 AChE 抑制率分布的测定

每个棉蚜种群中取 90 头棉蚜，分别以每头棉蚜加 60 μL 磷酸缓冲液（含 0.1% Triton X-100，pH7.4）匀浆[11]，按 Moores 等[12]方法进行测定，抑制率（%）=（对照酶活 − 抑制后剩余酶活）/对照酶活 × 100。计算每头棉蚜 AChE 活力和灭多威对 AChE 的抑制率，按李梅等[13]方法画出频率分布图。

2　结果与分析

2.1　生物测定

灭多威对北京和山东高密棉蚜的毒性见表 1。

表1 灭多威对棉蚜的毒性（LD_{50}：μg/蚜）

Table 1 The toxicity of methomyl to cotton aphid（LD_{50}：μg/aphid）

棉蚜种群 Population	LD_{50}	LD_{95}	b	抗性指数 Resistance index
北京种群 Beijing	0.00084 （0.00042～0.00129）	0.0082 （0.00465～0.0254）	1.657±0.246	1
高密种群 Gaomi	0.0076 （0.00335～0.0117）	0.038 （0.0211～0.217）	2.318±0.335	9.05

2.2 不同杀虫剂对棉蚜AChE的抑制作用

用北京棉蚜种群比较甲基1605、辛硫磷、久效磷、氧乐果、乙酰甲胺磷、残杀威和灭多威对棉蚜AChE的抑制作用（图1）。结果表明，不同浓度甲基1605、辛硫磷和乙酰甲胺磷对棉蚜AChE的抑制作用不明显，0.1 mol/L时这3种杀虫剂对AChE还有激活作用。不同浓度的久效磷和氧乐果对棉蚜的AChE有一定的抑制作用，其抑制率随浓度的增加稍有增加，在最高浓度0.1 mol/L时，其抑制率仅分别达到24.9%和21.8%。残杀威和灭多威对棉蚜AChE的抑制作用在最高浓度0.1 mol/L时，其抑制率可分别达到62.9%和59.2%，但不同浓度之间差异不明显，即使浓度提高，抑制率变化不大。由此表明用酶标板法测定棉蚜个体AChE对杀虫剂的不敏感性，只适合于氨基甲酸酯类杀虫剂如灭多威和残杀威等，而不适合于大部分有机磷杀虫剂。因此，酶标板法测试AChE不敏感性可以作为氨基甲酸酯类杀虫剂抗性的生化监测方法。

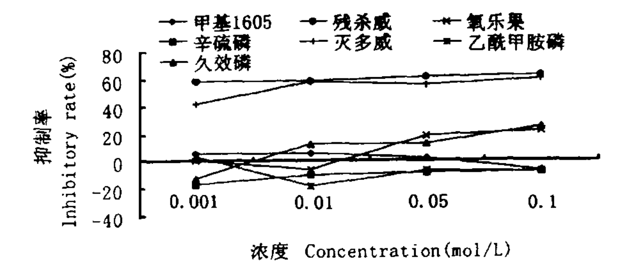


图1 不同杀虫剂对棉蚜AChE的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of different insecticides to acetylcholinesterase in cotton aphids

2.3 不同反应时间对不同浓度灭多威对棉蚜AChE抑制作用的影响

用北京棉蚜种群比较在不同反应时间不同浓度的灭多威对棉蚜AChE的抑制作用（图2）。结果表明反应0.5 h时，0.001，0.01和0.05 mol/L的灭多威对棉蚜AChE的抑制率分别为60%，75.7%和79.4%；反应1 h时分别为68.7%，82.4%和85.7%；反应2 h时分别为73.8%，89.4%和92.3%；低浓度灭多威（0.001 mol/L）反应2 h时其抑制率仅为73.8%；0.01 mol/L灭多威反应1 h和2 h时对AChE的抑制率分别可达82.4%和89.4%，二者仅差7%。当浓度提高到0.05 mol/L时，抑制率分别为85.7%和92.3%，二者相差3%。因此，认为采用0.01 mol/L的灭多威反应时间1 h作为酶标板法测试棉蚜AChE不敏感个体表现型比较合适。

2.4 不同棉蚜种群个体AChE活性的频率分布

从北京和山东高密和鼠李上棉蚜种群中棉蚜AChE活性的频率分布（图3）可以看到在OD值＜0.30的京鼠蚜有86%，京蚜有90%，高棉蚜有87%的个体；OD值＞0.50的，京蚜和京鼠蚜均为0，高棉蚜为13%。因此从京鼠蚜，京蚜和高棉蚜的种群间个体AChE的频率

分布推测差异不大，高棉蚜对灭多威的抗性可能与 AChE 的变构有关。

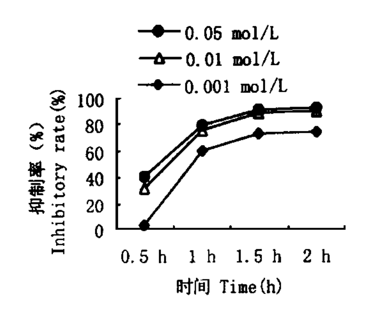


图 2　不同浓度灭多威在不同时间对棉蚜 AChE 的抑制作用

Fig. 2　Inhibition of insecticides on acetylcholinesterase in cotton aphids with different reaction times

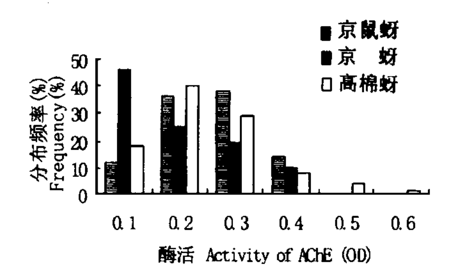


图 3　不同种群棉蚜 AChE 活性的频率分布

Fig. 3　Individual frequency of acetylcholinesterase activity in three cotton aphid populations

2.5　灭多威对不同棉蚜种群个体 AChE 抑制率分布

用0.01 mol/L 灭多威测试北京鼠李，棉苗和山东高密棉田的棉蚜种群个体 AChE 的抑制率分布（图 4）。结果表明，0.01 mol/L 的灭多威对北京鼠李、棉苗和山东高密棉田的棉蚜种群中个体 AChE 抑制率小于 30％的个体作为抗性个体，表现型分别为 2.4％，16％ 和 29％；抑制率大于 70％的个体作为敏感个体的表现型分别为 71.7％，33％和 1％。棉蚜种群个体棉蚜 AChE 对灭多威的不敏感型，中间型，敏感型的比例：京鼠蚜为 1∶11∶3；京蚜为：1∶3∶2；高棉蚜为 33∶80∶1。这清楚指出高棉蚜种群中个体 AChE 对灭多威的不敏感性个体比京蚜和京鼠蚜要高。证明了灭多威抗性与 AChE 不敏感性有一定关系。因此使用酶标板法测定个体棉蚜 AChE 对氨基甲酸酯不敏感性的方法可以作为测定棉蚜对氨基甲酸酯抗性的监测技术。

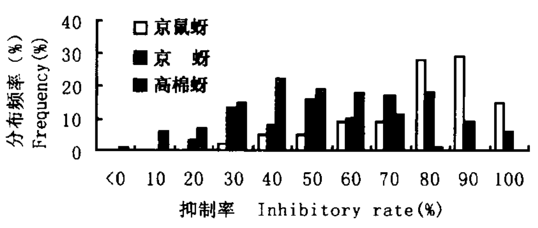


图 4　灭多威对不同棉蚜种群个体 AChE 抑制率的分布

Fig. 4　Frequency of inhibition rate by methomyl of individual acetylcholinesterase activity in three cotton aphid populations

3　讨论

棉蚜对氨基甲酸酯杀虫剂的主要抗性机制是由于棉蚜体内乙酰胆碱酯酶（AChE ）变构，杀虫剂对其抑制不敏感而产生抗性。1995 年报道了抗蚜威对温室中寄主黄瓜和菊花上棉蚜抗性的生化机制，抗蚜威对菊花上抗性棉蚜 AChE 的抑制中浓度（I_{50}）比敏感种群高出 900 倍，对底物的亲和性降低了 300 倍，证明了棉蚜对抗蚜威抗性的主要原因是由于 AChE 的变构引起的。Moores 等[12]认为在棉蚜中至少有 2 个 AChE 等位基因的变异。本文用酶标板法测定灭多威对北京地区鼠李，棉苗和山东高密棉田的棉蚜种群中个体 AChE 活性频率分布，3 个种

群除鼠李棉蚜种群内敏感个体比例较大外，北京棉苗和高密棉田的棉蚜种群间的差异不大，表明灭多威抗性与棉蚜 AChE 活力关系不大。而从测试灭多威对棉蚜个体 AChE 的抑制作用，可看出北京地区寄生在鼠李上棉蚜种群对灭多威的不敏感性频率比较低，以抑制率小于 30%的个体作为抗性表现型，鼠李种群仅为 2%个体，北京棉苗和山东高密棉田的棉蚜种群分别为 16%和 29%的个体，抗性个体数明显有了增加。以抑制率大于 70%的个体作为敏感表现型，鼠李上棉蚜种群中有 71%个体，北京棉苗和高密的棉蚜种群分别为 33%和 1%个体。高密种群中敏感个体数明显有了降低，这与生物测定结果基本相符。说明棉蚜个体 AChE 的不敏感性是氨基甲酸酯杀虫剂抗性的主要原因之一。

本文用微量酶标板法测定有机磷杀虫剂甲基 1605，辛硫磷和乙酰甲胺磷对棉蚜个体 AChE 均无抑制作用。用 0.5%的氧乐果和久效磷抑制率仅达 20%左右，各浓度之间与 AChE 不敏感的相关性不明显。高希武等[15]用 1.9×10^{-4} mol/L 浓度的氧乐果对 4 个地区桃蚜种群的 AChE 的抑制作用时，在反应 1.5 min 时平均抑制率达 32.3%～55.9%，并提出了与抗蚜威，马拉硫磷，氧乐果的抗性有一定相关性，由此说明棉蚜与桃蚜的抗性机制之间存在差异，尚待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

[1] Tanigucki T. Present situation of chemical control on the aphids of vegetable crops (In Japanese). Shokubutsu Boeki, 1987, 41: 165～169

[2] Sugiura T. Insect pests difficult to control of vegetables and their integrated control. (In Japanese). Nogyo Oyobi Engei., 1984, 59: 1 161～1 165

[3] Furk C, Powell D F, Heyd S. Pirimicarb resistance in the melon and cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. Plant Pathology, 1980, 29: 191～196

[4] O' Brien P J, Grafton-Cardwell E E, Handee D D. Screening of *Aphis gossypii* Glover for insecticide tolerance. In Insecticide & Acaricide Tests. 1990, Vol. 15. Entomological Society of American, London. 1989, 254～255

[5] Grafton-Cardwell E E. Geographical and temporal variation in response in to insecticides in various life stages of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphichidae) infesting cotton in California. J. Econ. Entomol., 1991, 84: 741～749

[6] 龚坤元，张桂林，翟桂荣. 棉蚜对 1059 的抗性. 昆虫学报，1964，13：1～9

[7] 郑炳宗，高希武，王政国等. 瓜-棉蚜对有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂抗性机制研究. 植物保护学报，1989，16：131～138

[8] Sun Yunqin, Guolei Feng, Jiagui Yuan *et al*. Insecticide resistance of cotton aphids in North China. Entomologia Sinica. 1994, 1: 242～250

[9] 慕立义，王开运. 我国棉花蚜虫对菊酯类农药及呋喃丹抗药性调查与研究. 农药，1986，2：1～6

[10] 孙耘芹，冯国蕾，袁家珪等. 棉蚜对有机磷杀虫剂抗性的生化机理. 昆虫学报，1987，30：13～20

[11] Guolei Feng, Li Mei, He Fengqin *et al*. Using filter paper test for detecting inhibitory frequency of organophosphate to esterases in cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover. Entomologia Sinica. 1996, 3: 70～79

[12] Moores G D, Xiwu Gao, Ian Denholm *et al*. Characterization of insensitive acetylcholinesterase in insecticide resistant cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover. Pestic. Biochem. Physiol., 1996, 56: 102～110

[13] 李 梅，冯国蕾，何凤琴等. 简易快速检测棉蚜对有机磷抗性的生化方法——滤纸酯酶反应法. 昆虫知识，1996，33：300～303

[14] Abdel-Aal Y A, Wolff M A, Roe R M *et al*. Aphid carboxylesterases: Biochemical aspects and importance in the diagnosis of insecticide resistance. Pestic. Biochem. Physiol., 1990, 38: 255～266

[15] 高希武，郑炳宗，曹本钧. 桃蚜对有机磷和氨基甲酸酯抗性机制研究. 植物保护学报，1992，19：365～371

The insensitivity of AChE in *Aphis gossypii* Glover to insecticides monitored by microplate assay method

FENG Guo-lei, LI Mei, ZHAO Zhang-wu , HE Feng-qin

(Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Integrated Management of Pest & Rodents, Beijing 100080)

Abstract: In this paper the microplate assay was used to determine AChE inhibition by different concentrations of organophosphate and carbamate insecticides. The results showed that there were no inhibition of organophosphate insecticides, such as methyl parathion, monocrotophos, omethoate and acephate to the AChE of cotton aphid. By measuring the AChE activity of individual cotton aphids on cascara and on cotton seedling in Beijing and Gaomi, Shandong Province, along with the inhibitory frequency of methomyl to it, it was found that the distributive frequency among individual AChE activities was similar among the three populations of cotton aphid tested. The individuals with inhibitory rate of methomyl to individual AChE below 30% in the three different populations were amounted to 2.4%, 16%, 29%, respectively. The individuals with inhibitory rate over 70%, accounted for 72%, 33% and 1% of the three populations respectively. The difference among these three populations was noticeable, and this result was in accord with the outcome of biological measurement. Consequently the method of microplate titer assay would be a better forecast skill for determinating insensitivity of AChE to carbamate insecticides in cotton aphid. It might be helpful for releasing pest resistance.

Key words: cotton aphid; microplate assay; acetylcholinesterase; insecticide